



Völgyi Béla, PhD,

Habilitált egyetemi docens

Válaszok

Prof. Tamás Gábor egyetemi tanár által „A réskapcsolatok szerepe a retina párhuzamos információs csatornáinak működésében” című MTA doktori értekezéssel kapcsolatban feltett kérdéseire

1. A jelölt potenciálisan érdekes felvetése, hogy az All amakrin sejtek transzverzális nyúlványainak eredésénél dopaminerg amakrin sejtek axonjai figyelhetők meg, ennél fogva felmerül a réskapcsolatok dopaminerg kapuzási mechanizmusa. Több ponton nem világos számomra ez a javaslat. Egyrészt, milyen alapon általánosít a jelölt a „TH/PV kettősjelölt minta **egyetlen** All amakrin sejtjének digitálisan rekonstruált képe” (10 ábra C panel) által mutatott transzverzális dendrit innerváció alapján? Véleményem szerint egyetlen sejt alapján nem vonható le tudományos következtetés az adott mintára vonatkozóan sem, nemhogy általánosságban. Az eredeti közlemény alapján sem világos számomra, hogyan alakult ez a jelenség populáció szinten, hány állatban és hány további sejtben sikerült ezt kimutatni?

Bírálóm véleményével teljes mértékben egyetértek, egyetlen sejt alapján nem vonható le tudományos következtetés. Az említett példa sem ilyen. Az All sejtek transzverzális dendritjeivel átfedő, vagy azokkal juxtapozícióban elhelyezkedő TH+ struktúrák nem csak a 10c ábrán láthatóak, hanem majdnem minden olyan All sejtben, amelynek a nyúlványrendszere az immunjelölt szöveten elkülöníthető. Az ezt leíró publikációnkban (Völgyi és munkatársai 2014) vannak olyan egyéb ábrapanelek, melyek ugyan más megfigyelés bemutatását szolgálják, de ez a jelenség is jól látható rajtuk; ilyenek az első ábra (g, h és m panelek), a kettes ábra (e, f és g panelek), és a hármas ábra (c, d és e panelek). A kísérletekhez 3 New Zeland nyúl 5 retináján végeztük el a vizsgálatokat. A kvantifikációt és az ezzel kapcsolatos analízist 5 db z-szettekben hajtottuk végre. Sejtszámra vonatkozó adatot a publikációban azért nem adtunk meg, mert az immunjelölt struktúrák számából nem lehet direkt módon következtetni sejtszámokra, így csak az All és a TH+ sejtek struktúrái közötti kapcsolatok (kettősjelölés és juxtapozíció) százalékos arányát vizsgáltuk.

2. Milyen a dopamin receptorok ultrastrukturális eloszlása az All sejteken, különös tekintettel a réskapcsolatok elhelyezkedésére? Ha elfogadjuk az irodalomból ismert parakrin kommunikációt az All sejtek dopaminerg innervációjával kapcsolatban, hogyan képzelel el a jelölt a szómára koncentrált dopamin felszabadulás és a potenciálisan foszforilációval modulált réskapcsolatok közötti információátvitelt, illetve milyen működési/fényadaptációs állapotokban kombinálódik mindez az ugyanitt kotranszmitterként felszabaduló GABA-val?

Contini és Raviola 2003-as munkájukban mutatnak olyan elektronmikroszkópos felvételt, amely dopamintermelő amakrin sejt nyúlványa és All sejttest között létrejött kémiai szinapszis mutat egér retinában. Hasonló szinapszist Anderson és munkatársai (2011), illetve Marc és munkatársai (2014) írtak le nyúl retinában. Az utóbbi munkában 4-6 nagy méretű kémiai szinapszist figyeltek meg a dopaminerg axonok és minden egyes vizsgált All sejt sejttestje között. Ezekben a publikációkban ugyanakkor nem esik szó arról, hogy dopaminerg sejtek

szinapszist képeznének az AII transzverzális nyúlványokkal. Tehát az általunk leírt rost proximalitás valószínűleg csak fizikális, nem szinaptikus felületeknek helye. Ugyanakkor a dopaminerg szinapszisok hiánya a transzverzális nyúlványokon nem zárja ki extraszinaptikus D1 receptorok jelenlétét ezeken a területeken, ahová a parakrin módon felszabaduló dopamin diffúzió útján juthat el és fejtheti ki hatását. Egy ilyen parakrin hatás esetén a két rosttípus (TH+ és AII transzverzális dendrit) fizikális közelsége kifejezetten előnyös lehet, ugyanis a rövid diffúziós távolság miatt a reakciósebesség kicsi, a relatíve magas dopaminkoncentráció miatt az érzékenység magas lesz. Saját méréseinket az irodalmi adatokkal kombinálva tehát az extraszinaptikus D1 receptorokon keresztül kifejtett hatás a legvalószínűbb a transzverzális nyúlványok esetén. Ezt az elképzelést egyébként Hirasawa és munkatársai (2015) és Witkovsky (2004) publikációi is megerősítik, melyek szerint a TH+ sejtek által felszabadított GABA szinaptikusan, a dopamin extraszinaptikusan (volum transzmisszió útján) fejt ki hatását az emlős retinában. Yadav és munkatársai 2019-es publikációja immunhisztokémiai bizonyítékot is mutat arra vonatkozóan, hogy az AII amakrin sejtek transzverzális nyúlványai D1 receptorokat tartalmaznak, mely területekről tehát tudjuk, hogy nem posztzinaptikus felületek a TH+ sejtekkel alkotott kapcsolatokban. Ez utóbbi adat szintén a dopaminnak az AII transzverzális nyúlványain kifejtett extraszinaptikus hatását bizonyítja.

Az AII sejtestek innervációja és a transzverzális nyúlványokon elhelyezkedő elektromos szinapszisok regulációja közti összefüggéssel kapcsolatos kérdésre potenciálisan magyarázható az AII sejtek viszonylag kis méretével (még a perifériás retinális területeken sem nagyobb a fa átmérője 20 μm -nél), amely lehetővé tenné a szomatikus dopaminerg szinapszis hatását közvetítő jelmolekulák diffúzióját a nyúlványok réskapcsolataihoz. Ennek a véleménynek ellentmond Zandt és munkatársai 2018-as közleménye, mely szerint az AII sejtek kis méretük ellenére erősen kompartmentalizáltak. Ez utóbbi eredmények és saját kompartmentalizációt sejtető adataink ismeretében én magam is úgy gondolom, hogy az AII sejtek esetében a sejttest és a nyúlványok közötti elektromos és/vagy molekuláris kommunikáció meglete egyáltalán nem triviális. Ugyanakkor a dopaminnak a transzverzális nyúlványokon elhelyezkedő extraszinaptikus D1 receptorain kifejtett réskapcsolat moduláló hatása nem kizárt, sőt valószínű.

Az AII sejtek esetében a dopamin iniciálta intracelluláris szignálmechanizmus részben feltárt. A retinában a fényadaptáció alapvető molekulája a dopamin, ami a fent említett TH+ amakrin sejtekből szabadul fel tartós megvilágításkor. A dopamin az AII sejtek D1 receptoraihoz köt és G_s aktiváció útján cAMP szintemelkedést és protein kináz A (PKA) enzimaktivációt vált ki (Hampson et al. 1992; Mills & Massey 1995). A PKA nem közvetlenül fejt ki hatását a Cx36 alegységekre, hanem a citoplazma protein foszfatáz 2A molekuláit foszforilálja, melyek ezután a Cx36 alegységek defoszforilációját végzik el mind az AII-AII, mind az AII-ON csap bipoláris kapcsolatokban (Kothmann et al. 2009). A Cx36 defoszforiláció pedig az elektromos szinapszisok áteresztőképességének csökkenéséhez, az AII sejtek szétkapcsolásához vezet. Ettől részben független hatás a Cx36 alegységek aktivációfüggő foszforilációja. Ebben az esetben az ON csapbipolárisokkal alkotott kémiai szinapszisok környezetében glutamát 'spill-over' hatásra extraszinaptikus NMDA csatornák aktiválódnak, ami az intracelluláris Ca^{++} szint átmeneti emelkedését, majd CaMKII-függő Cx36 foszforilációt indukál (Kothmann et al. 2012). Ez utóbbi folyamat során a dopamin moduláló szerepe nem bizonyított. A fentiek ismeretében az intracelluláris cAMP diffúziós tulajdonságai azok, amelyek meghatározhatják a D1 szignálútvonal és a réskapcsolatok kapuzásának mechanizmusát. Az intracelluláris szignalizáció túlmenően Yadav és munkatársai 2019-es publikációja, valamint saját eredményeink is bizonyítékot szolgáltatnak az extraszinaptikus D1 receptorok jelenlétére AII amakrin sejtek transzverzális nyúlványain, melyek dopamin kötése szükségtelenné teszi az intracelluláris cAMP diffúziót.

$\alpha 1$ és $\alpha 3$ GABAA receptor alegységek jelenlétét sikerült Contini és Raviola 2003-as munkájában kimutatni az egér és a patkány retina TH/All szomatikus szinapszisok területén. Részben ebből a megfigyelésből ered a GABA innervációs teória, aminek ismeretében szerettük volna saját mintáinkon megfigyelni és számszerűsíteni ezeket a GABA-erg szinapszisokat. Kísérleteinkben többszörös immunjelöléseket végeztünk a TH-ra, calretininre (CaR – több amakrin sejt típus markere), GABA $\alpha 1$ alegységre (anti-GABAAR $\alpha 1$ – posztzinaptikus marker) és vezikuláris GABA transzporterre (anti-vGAT – preszinaptikus marker) vonatkozóan. Az egér retinában hármass együttállást figyeltünk meg TH+ gyűrűk, CaR+ sejttestek és vGAT plakkok esetén, illetve TH+ gyűrűk, vGAT plakkok és GABA $\alpha 1$ juxtapozíciót találtunk több ízben. Ez a kvalitatív megfigyelés látszólag tehát a Contini/Raviola-féle GABA-erg innervációs elmélet mellett szól. Ugyanakkor a vGAT és a GABA $\alpha 1$ jelölés nagy denzitása miatt a kolokalizációk számát összevetettük a random kolokalizációk számával, melyhez az egycsatorna elforgatáson alapuló negatív kontrollt alkalmaztuk. Meglepetésünkre azt az eredményt kaptuk, hogy mintáinkban a kolokalizáció aránya gyakorlatilag a véletlenszerű eloszlásénál nem nagyobb (gyakran alacsonyabb). Ezeket az eredményeket ugyan egyelőre nem publikáltuk, de Debertin Gábor PhD dolgozatának szerves részét képezték. Így saját adataink alapján úgy gondolom, hogy az All sejtek szomatikus GABAerg innervációja felülvizsgálatra szorul.

3. A tracer-kapcsolt réskapcsolat kimutatás visszatérő motívuma a dolgozatnak és hangsúlyos a réskapcsolatok elhelyezkedésének tárgyalása is. A jelölt az irodalommal összhangban szomszédos dúcsejtek spontán akciós potenciáljai közötti keresztkorrelációs vizsgálatokkal kimutatta, hogy a réskapcsolatokkal összekötött sejtek között szinkronizáció figyelhető meg. Milyen funkcionális vizsgálatokkal igazolta a disszertáns a réskapcsolat funkció sejtben belüli pozíciótól való függését a retinális folyamatokban, vagy ennek hiányában milyen irodalmi adatok erősítették meg ennek funkcionális jelentőségét?

Korábban Hidaka és munkatársai (2004) figyelték meg a Cx36 réskapcsolatokat szomszédos alpha dúcsejtek egymással átfedő dendritcsúcsain patkány retinában és kettős elvezetésekkel ezek szerepét bizonyították a dúcsejtek közötti kommunikációban. A közvetlen, kétirányú információáramlásra utaló jelenséggént értékeltük kísérleteinkben a kettős keresztkorrelációs csúcsok jelenlétét diagramjainkon. Ezen felül egy, az értekezésben még nem szereplő újabb munkánk (Kántor és munkatársai 2018) során megfigyeltük, hogy humán dúcsejtek Cx36 réskapcsolatai gyakran figyelhetők meg dendritvégeken vagy azok közelében. Valószínű, hogy ez utóbbi réskapcsolatok is a dúcsejtek közötti direkt kommunikációban vesznek részt. Tudtommal mindeztidáig nem történtek vizsgálatok arra vonatkozóan, hogy a dúcsejt-dúcsejt elektromos szinapszisok sejttest viszonyított elhelyezkedése hogyan befolyásolja a sejtek közötti szignál terjedését. Ugyanakkor megfigyeltük, hogy a nyúl retina OFF alpha dúcsejt párpai esetén a keresztkorrelációs csúcsok időkéseése relatíve nagy (> 2 ms; DeVries 1999; Hu és Bloomfield 2003), míg az egér retinában ez az érték alacsonyabb (~ 1.4 ms; Völgyi és mtsai 2013). Elképzelhető, hogy az eltérés oka a nyúl alpha sejtek 40-50%-al nagyobb dendritfája és az ezzel összefüggő arányosan hosszabb út, amelyet a sejttestek között az ionáramok megtesznek. Hasonló vezetési sebességeket feltételezve az eltérő méretek magyarázhatják a nyúl alpha sejtek közötti szignalizáció viszonylagos lassúságát. Ha ez a feltételezés megállja a helyét, bírálóm kérdésére közvetett válasz adható, azaz a dúc-dúcsejt elektromos szinapszisok sejttestektől mért távolságával arányosan nő a korreláló akciós potenciálok közötti időkéseése. Ellenben a RGC-RGC szinapszisokkal, az OFF alpha sejtek széles dendrit-mezejű amakrin sejtekkel alkotott elektromos szinapszisaival, a dendritfa bármely részén előfordulhatnak és alapvetően más lefutású keresztkorrelációs csúcsokért felelnek. Részben ez utóbbi tulajdonságuk miatt feltételezzük, hogy a dúcsejt elektromos szinapszisok e két populációja a képi jel kódolása szempontjából különböző szerepet tölt be.

4. A dopaminerg fényadaptáció során feltételezett egysejt kódolás-populációs kódolás átmenet véleményem szerint a disszertáns javaslatán túl alternatív következményekkel is járhat. Miért lenne előnyös az intercelluláris kommunikáció jel-zaj viszonyának csökkentése fényadaptált retinában? A fénystimulus kiváltotta EPSP-k amplitúdó csökkentése és átszivárgása a nyitott réskapcsolatokon keresztül a szomszédos, kapcsolt sejtekbe hogyan segítené elő a fényadaptált retina jeltovábbítását/feldolgozását a központok felé a sötétadaptált helyzethez képest?

A jel/zaj viszony csökkenése nem előnyös semmilyen jelátviteli mechanizmus szempontjából. De ha ez a csökkenés az ára annak, hogy egy újabb funkció (egy másik képi tulajdonság kódolása) ezáltal megvalósulhasson, akkor a látásérzet egésze szempontjából ez egy 'kifizethető ár' lehet. Fényadaptált körülmények között az egyszerre beérkező fotonok mennyisége nagy, így elképzelhető, hogy a jel/zaj viszony kismértékű csökkenése az egysejt kódolási mód hatékonyságát számottevően nem befolyásolja. Ha mégis romlik az egysejt üzemmód határfoka a jel/zaj viszony romlása miatt, valószínű, hogy a populációs üzemmód erősödése általi képi kódolás bőven ellensúlyozza azt. Az elektromos szinapszisok által létrejövő 'ionáram elszivárgás' nem az agyi látóközpontok felé történő jel továbbítását segítené elő, hanem egyes képi jelegek rögzítését. Ez az elképzelés egyelőre egy elmélet, melynek bizonyításán folyamatosan dolgozunk, de vannak elképzeléseim arra vonatkozóan, hogy milyen konkrét mechanizmusokról lehet szó. Amikor egy mozgó tárgy a vizsgált sejt pár egyikének receptív mezőjébe kerül, az sejtmembránon depolarizációt vált ki. Az indukált ionáram egy része a dúcsejt réskapcsolatokon keresztül a szomszédos sejtekbe szivárog és azok dendritjein is depolarizációs hullámot vált ki. Az elmozdulás irányába eső szomszédos sejt esetén ez az elődepolarizáció hozzáadódhat a stimulus kiváltotta áramhoz. Ez a mechanizmus már nem a tárgy jelenlétének, hanem az elmozdulásnak (esetleg az elmozdulás irányának) tényét kódolja. Nyilvánvalóan a dúcsejtek közötti laterális kommunikáció bizonyos képi aspektusok (pl. kontrasztok) detektációja szempontjából előnytelen, hiszen rontja a térbeli felbontóképességet az adott dúcsejt populáció számára. Viszont jellemzően a nagyméretű dúcsejtek (pl. az OFF alpha sejtek) feladata általában nem a kontrasztérzékelés, hanem a mozgó kép egyes időbeli jellegének kódolása.

5. A közlemények tudománymetriai szempontból megfelelnek az MTA doktora címmel kapcsolatban támasztott követelményeknek. A bíráló ezen a ponton kénytelen megjegyezni, hogy a közlemények alapvetően két csoportra oszthatók. A jelöltnek a Bloomfield laboratóriumban (NYU, USA) végzett tevékenysége minőségi szempontból messze meghaladja a valóban önálló témavezetőként a Pécsi Tudományegyetemen kivitelezett kutatásait. Ez azért is elgondolkodtató, mert a jelölt és kutatócsoportja hazánkban is nemzetközi szintű finanszírozásban részesült, ráadásul kutató ösztöndíjasként oktatási terhelése sem érhetne el a hazai egyetemi átlagot. Mivel a forrás- és időhiány ebben az esetben nem áll fenn, kérdezem, hogy a jelölt mivel indokolja a költséghatékonyság csökkenését pályafutásának hazai szakasza alatt?

A munka valóban két korszakra osztható, ugyanakkor a fenti sorok pontosítást igényelnek. Az önálló kutatómunkát 2007-ben kezdtem a külföldi laborban, amikor már saját forrás állt rendelkezésemre (NIH-R01). Ennek összege az 5 évre körülbelül 427 millió HUF (285 HUF/USD-vel számolva) a teljes 5 éves időszakra, azaz évi 85,5 millió HUF volt. Ez idő alatt 9 db publikáció és 70,212 összesített impakt faktor (IF) született. A hazatelepülést követően a Magyarországon végzett kutatómunka a 2012-2019 időszakra vonatkozik. A 7 év alatt K OTKA, NAP-B, NAP2 és NN OTKA pályázati forrásokhoz jutottam, ezek összesen 247 millió HUF értékben, mely évente 30-31 millió HUF támogatást jelent. Az időszak 7 éve alatt 21 publikáció és 80.489 IF született. Ezek a számok azt mutatják, hogy a külföldi laborban 9 M HUF jut egy cikkre, itthon ez 1.4 M HUF. A további számításoknál az egyszerűség kedvéért nem vettem figyelembe azt a nagyon fontos különbséget, hogy az NIH pályázati kifizetés esetén a kutató nem fizet ÁFÁ-t sem eszköz, sem dologi vásárlást követően, miközben ezek a tételek a magyar pályázatok esetén igen

jelentős 27% ÁFÁ-val terheltek. Visszatérve a fenti számokhoz elmondható, hogy a külföldi laborban 1.184 M HUF jut egy IF-ra, itthon ez az érték 383 ezer HUF, tehát kevesebb, mint harmada a külföldi laborénak. Ezen számok ismeretében egyáltalán nem gondolnám, hogy a hazai kutatómunkám kevésbé költséghatékony a külföldinél. Azzal ugyanakkor egyetértek, hogy a külföldi munka során több volt a magas impaktú közlemény, míg a hazai munka nagyobb számú, alacsonyabb impaktú közleményt eredményezett. Ugyanakkor egyrészt a külföldi munka során is születtek alacsonyabb impaktú publikációk. Ezek között van olyan (Völgyi és munkatársai 2009), amely leíró jellege miatt a Journal of Comparative Neurology-ban jelent meg (IF 3.718), mégis 2009 óta több, mint 260 citációt gyűjtött. Figyelembe kell venni azt is, hogy a külföldi laborban már minden a rendelkezésemre állt munkám kezdetekor, ugyanakkor Magyarországon laborépítéssel és új munkatársak keresésével kezdődött a munka. Ez utóbbi tényezők miatt a hazai kísérletes munka főleg immunhisztokémiai és molekuláris biológiai kísérletekkel és az ezekből születő leíró közlemények publikálásával kezdődött. A dinamikusan bővülő technikai repertoárunknak köszönhetően a labor munkatársai mára funkcionális vizsgálatok több típusát is végzik (képalkotási kísérletek, patch-clamp elektrofiziológia, MEA és HD-MEA extracelluláris elvezetések, sejtfeltöltések) és legújabb publikációink (Ganczer és munkatársai 2017; Tengölics és munkatársai 2019) már ezeket a technikákat felhasználó eredményeket is tartalmazzák. Mindazonáltal nem szeretném, ha válaszom mentegetőzésnek hatna. Tudatában vagyok annak, hogy a közleményeink hatását emelnünk kell azzal, hogy nemzetközileg még elismertebb lapokban hozzuk nyilvánosságra. Ez számomra is és a labor munkatársai számára is cél, és úgy gondolom, hogy az újabb mérési technikáinkkal felvértezve erre van is lehetőségünk.

Pécs, 2020. február 1.

Völgyi Béla